

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

## 经验分享：利用CTxB的逆向运输追踪内吞体到高尔基体的运输

abcam abcam 2018-01-31

请关注： [↑ Abcam 助您尽快实现研究使命](#)



Abcam  
小艾有话说

为促进abcam用户之间技术交流，我们将陆续发布由用户提供的技术分享。本文作者为江南大学博士生赵神保，他擅长免疫荧光及共定位实验，欢迎留言向他提问。

### 背景介绍：

蛋白质在内质网中正确折叠后运输到高尔基体，再运输到细胞膜或分泌到细胞外的过程叫顺向运输。相对于顺向运输，逆向运输是指蛋白或分子从细胞膜经过内吞体到高尔基体的运输途径。逆向运输对于调节细胞营养吸收，溶酶体生成和铁离子浓度平衡等有重要作用。

霍乱毒素由A，B两个亚基构成，其中霍乱毒素B亚基（Cholera Toxin Subunit B，CTxB）能结合细胞膜表面神经节苷酯（Monosialoganglioside，GM1），如图A。被荧光标记的CTxB在结合GM1之后能被内吞和运输，随着时间推移，该复合体经过内吞体到达高尔基体(图片B)，使该荧光标记可示踪细胞的逆向运输。



图片A

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。



图片B

---

### 试剂和材料:

- HEK293细胞
- Cholera Toxin Subunit B, Alexa Fluor™ 488 Conjugate
- PBS
- 4% PFA
- 50 mM NH<sub>4</sub>Cl
- 24孔板
- 荧光显微镜
- DAPI染液
- 多聚赖氨酸
- 细胞爬片
- 一抗稀释液
- 二抗稀释液

---

此**实验步骤**: 仅用于预览, 将在短期内失效。

### 第1步, 准备细胞爬片。

在24孔板中放入已灭菌的细胞爬片, 之后用0.1mg/mL多聚赖氨酸浸泡10分钟, 吸干, 室温晾干。

每个孔加入 $2 \times 10^4$  (10%的接种量) 活性高的细胞悬液, 置于37°C培养2天。

### 第2步, 标记

细胞在盖片上生长融合到50-80%时, 更换成不含血清的培养基 (DMEM), 饥饿培养30分钟。之后从孵箱中取出, 用冷的PBS润洗一次, 加入200 $\mu$ L终浓度为10 $\mu$ g/mL 的CTxB, 4°C静置标记2分钟。之后用冷PBS洗去未结合的CTxB, 加入500 $\mu$ L预热的培养基继续分别培养5分钟和60分钟。CTxB刚开始标记在细胞表面, 之后开始内吞, 大约30分钟后到达高尔基体。

### 第3步, 固定和复染

培养好的细胞用PBS洗一次后, 加入400 $\mu$ L的4% PFA室温固定20分钟。PBS洗一次后, 加入500 $\mu$ L的50Mm NH<sub>4</sub>Cl中和10分钟。PBS润洗一次。

通透: 250 $\mu$ L的0.1 % Triton X-100 (PBS) 处理30分钟。PBS 洗一次。

封闭: 5% BSA (PBS) 处理30分钟。吸干, 不洗。

加一抗: 利用一抗稀释液将抗体稀释到适宜浓度, 室温避光1小时。PBS洗三次。轻轻摇晃。

加二抗: 利用二抗稀释液将抗体稀释到适宜浓度, 室温避光1小时。PBS洗三次。轻轻摇晃。

### 第4步, 封片

在载玻片上加入5 $\mu$ L的DAPI染色液, 将片子小心取出, 置于载玻片上, 指甲油封闭, 室温避光3小时后镜检。

---

### 注意事项:

1. HEK293细胞贴壁不牢, 用多聚赖氨酸促进贴壁, 操作时应轻柔。
2. 在标记之前应用不含血清的培养基饥饿处理细胞, 使细胞处于饥饿状态, 加强内吞效率。
3. 标记时应在4°C, 降低标记时的内吞反应。

---

### 实验结果:

1. 单标记

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

## 2. 双标记

在这片文章中(1)，敲弱ATP8A1后，CTxB内吞60分钟后任然停留在回收内吞体（Recycling endosome），然而在野生型细胞中会顺利运输到高尔基体（GM130标记）。

---

### References:

1.Lee S, Uchida Y, Wang J, Matsudaira T, Nakagawa T, Kishimoto T, Mukai K, Inaba T, Kobayashi T, Molday RS, Taguchi T, Arai H. Transport through recycling endosomes requires EHD1 recruitment by a phosphatidylserine translocase. EMBO J 2015;34(5):669-688.

---

### 推荐产品:

一抗: Anti-GM130 antibody [EP892Y] - cis-Golgi Marker ([ab52649](#))

二抗:

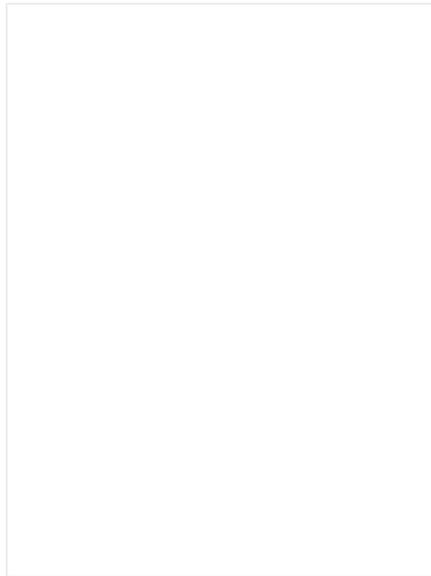
--	--

<a href="#">150117</a>	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preadsorbed
<a href="#">150081</a>	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preadsorbed
<a href="#">150084</a>	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) preadsorbed
<a href="#">150120</a>	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 594) preadsorbed

试剂盒:

Golgi Staining Kit - Green Fluorescence - Cytopainter ([ab139483](#))

Golgi/ER Staining Kit- Cytopainter ([ab139485](#))



江南大学博士生赵神保

